

氏 名	森 芳和
学 位 の 種 類	博士 (薬学)
学 位 記 番 号	博甲第1031号
学位授与の日付	平成20年3月22日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	PDGF β 受容体阻害剤としてのインドリルキノキサリン類の構造活性相関に関する理論的研究
論文審査委員 (主査)	宮本 謙一 (医学部附属病院・教授)
論文審査委員 (副査)	辻 彰 (自然科学研究科・教授), 石橋 弘行 (自然科学研究科・教授), 松尾 淳一 (自然科学研究科・准教授), 松下 良 (自然科学研究科・准教授)

Platelet-Derived Growth Factor- β Receptor (PDGF β R) is an attractive therapeutic target for restenosis and cancer treatment. In the present study, quinoxalin-2-one derivatives already have been identified as potent inhibitors for PDGF β R by Tsumura & Co. To accelerate the lead optimization process of these derivatives, structure-based drug design by utilizing structural information of a PDGF β R is the most desired approach. However, due to the lack of structural information of PDGF β R from experiment, we in this work have used molecular modeling techniques for the construction of 3D structure of PDGF β R and analysis of molecular interaction of quinoxalin-2-one derivatives with PDGF β R. Molecular modeling techniques consist of the comparative modeling using the structural template of the homologue kinases, molecular dynamics simulation and ligand-docking simulation. As the results of molecular modeling of PDGF β R in the inactive state, two structural models having the good ligand binding potential were obtained. In order to determine the final model from two candidates, we evaluated the structural activity relationship (SAR) between the ligand binding score and inhibitory activity value (IC₅₀ value) for available quinoxalin-2-one derivatives. Consequently, the final model with high SAR was identified. This model displayed the molecular interaction between the hydrophobic pocket behind the ATP binding site and the substitution part of the quinoxalin-2-one derivatives. These findings would be useful in lead optimization process of quinoxalin-2-one derivatives for PDGF β R inhibitors

本文

血小板由来増殖因子β受容体 (PDGFβ受容体)は、さまざまな癌¹⁾や再狭窄²⁻⁶⁾などの増殖性の疾患に関する創薬ターゲットとして注目されているチロシンキナーゼファミリーの1つである。そのため、PDGFβ受容体阻害剤は、これまでも STI-571^{7,8)}、CT52923⁹⁾、SU11248^{10,11)}、AGL2033¹²⁾などに代表される多くの有望な阻害剤が見出されている(Fig. 1)。

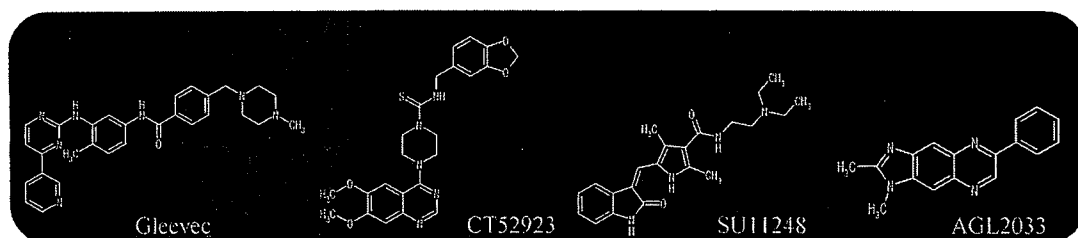


Fig. 1. The structures of typical PDGFβ receptor tyrosine kinase inhibitor.

著者らも独自にこれら阻害剤に匹敵する新規インドリルキノキサリン類を見出し、既存の阻害剤以上の阻害活性と PDGFβ受容体選択性を有する阻害剤の開発を目的に構造最適化を進めてきた(Table 1)¹³⁾。しかしながら、より高活性・高選択的な阻害剤への構造最適化には、未だ立体構造が解明されていない PDGFβ受容体とインドリルキノキサリン類との相互作用情報が必要不可欠である。よって本研究では、PDGFβ受容体チロシンキナーゼとインドリルキノキサリン類の相互作用情報抽出を目的として、これらの複合体モデルを分子モデリング技術により予測し、阻害活性値(IC₅₀値)を用いた構造活性相関により相互作用情報の評価を行なった。以下に本研究で実施した手順とその結果についてまとめ、最後に本研究の問題点および課題について考察する。

Table 1. Structure and activity of quinoxalin-2-one derivatives

Cpd.	R:	IC ₅₀ (μmol/l) ^{a)}
1	cyclohexylmethyl	0.030
2	n-propyl	0.905
3	n-butyl	0.020
4	n-pentyl	0.007
5	n-hexyl	0.010
6	n-heptyl	0.050
7	n-octyl	0.230

a) IC₅₀ values for the inhibition of PDGFβ receptor auto-phosphorylation of human AoSMC *in vitro*.

本研究は、以下の手順により実施した:①PDGFβ受容体チロシンキナーゼドメインのモデリング、②モデル構造の最適化、③インドリルキノキサリン類のドッキング計算、④自己リン酸化阻害活性との構造活性相関による評価。①では、自己リン酸化阻害活性を考慮した不活性型構造を FGFR3、FLT3¹⁴⁾、LCK¹⁵⁾および FGFR1¹⁶⁾などの類縁タンパク質の構造に基づいて構築した。②では、モデ

ル構造を初期構造として、分子動力学シミュレーション法を用いて様々な構造状態のモデルサンプリングを行った¹⁷⁻²¹⁾。サンプリングしたモデルの中からインドリルキノキサリン類のドッキングシミュレーションに最適な構造状態をリガンド結合ポケットの形状と Cpd.1 の形状と比較することにより予測した。③では、②で得られた予測構造とリード化合物である Cpd.1 とのフレキシブルドッキング計算を行い、候補となる結合様式を列挙した²²⁾。次に候補となる結合様式毎に、Cpd.1-7 のドッキング計算を行った。④では、ドッキング計算により得られた Cpd.1-7 との複合体構造から MM-GBSA 法により、結合エネルギーを計算した²³⁾。計算した結合エネルギーと自己リン酸化阻害活性値の比較から構造活性相関を解析し、インドリルキノキサリン類の結合様式ならびに相互作用情報を抽出した。

その結果、PDGFR β 受容体キナーゼドメインのモデリング及びインドリルキノキサリン類のドッキング結果より、ATP 結合部位周辺にはインドリルキノキサリン類が結合可能なポケットが存在し、さらに、そのポケットを充填するインドリルキノキサリン類の結合には、2 種類の結合様式 (Model 1, Model 5) が考えられることがわかった (Fig. 2)。

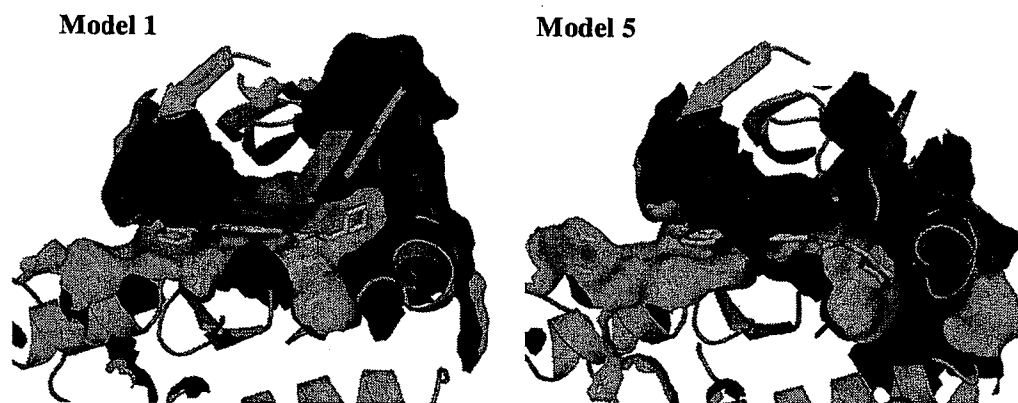


Fig. 2. Two proposed modes for Cpd.1 binding to PDGFR β receptor, from induced fit docking. The green surfaces indicate the Cpd.1 binding pockets on Models 1 and 5. Blue, magenta, and orange surface colors indicate the Hinge region, the Kinase insert region replaced by Ala-Ala-Ala, and the Activation loop, respectively. Cpd.1 is shown as a stick model

この2つの結合様式候補に対し、インドリルキノキサリン類の各結合エネルギーと IC_{50} 値との相関を解析した結果、Model 1 に相関傾向がみられた (Table 2, Fig. 3)。

Table 2. Apparent IC₅₀ value (μmol/l) and Binding energy (kcal/mol) calculated by Prime MM-GBSA.

Cpd.	R	IC ₅₀ (μmol/l) ^{a)}	Binding Energy(kcal/mol) ^{b)}	
			Model 1	Model 5
1	cyclohexylmethyl	0.030	-79.52	-77.68
2	<i>n</i> -propyl	0.905	-75.71	-66.54
3	<i>n</i> -butyl	0.020	-79.02	-73.26
4	<i>n</i> -pentyl	0.007	-82.23	-74.26
5	<i>n</i> -hexyl	0.010	-83.61	-74.47
6	<i>n</i> -heptyl	0.050	-76.76	-78.78
7	<i>n</i> -octyl	0.230	-75.81	-79.47

a) IC₅₀ values for the inhibition of PDGFβ receptor auto-phosphorylation of human AoSMC *in vitro*.
b) Binding energy = Complex_Energy – Receptor_Energy – Ligand_Energy + Ligand_Strain_Energy.

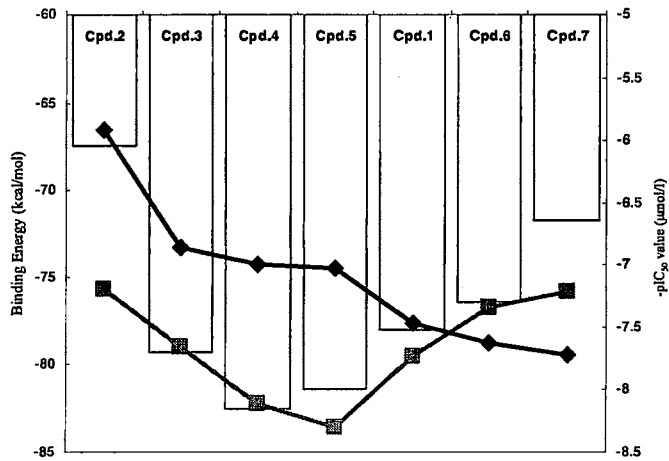


Fig. 3. Correlation -pIC₅₀ value (μmol/l) and Binding energy (kcal/mol) of calculated by Prime MM-GBSA. Pink and dark blue colors of line plots, respectively, indicate the binding energy of Cpd.1-7 with Models 1 and 5. Light yellow color of bar plot indicate the -pIC₅₀ values of Cpd.1-7 for the inhibition of PDGFβ receptor auto-phosphorylation of human AoSMC *in vitro*.

この結果から、PDGFβ受容体とインドリルキノキサリン類の相互作用プロファイルは、オキソキノキサリン環の C=O と NH がヒンジ領域の 684CYS (backbone NH), 682GLN (backbone C=O) と、ウレア部分の NH が 681THR (side chain OH) と、ウレア部分の C=O が 634LYS (side chain NH₃⁺) と、さらにはピリジン環の N が 6ARG (side chain NH₂⁺) などとの水素結合とアルキル部分が 652LEU, 655MET, 667LEU, 679ILE と疎水相互作用していることが示唆された (Fig. 4)。この相互作用情報は、今後の化合物最適化に重要な情報である。

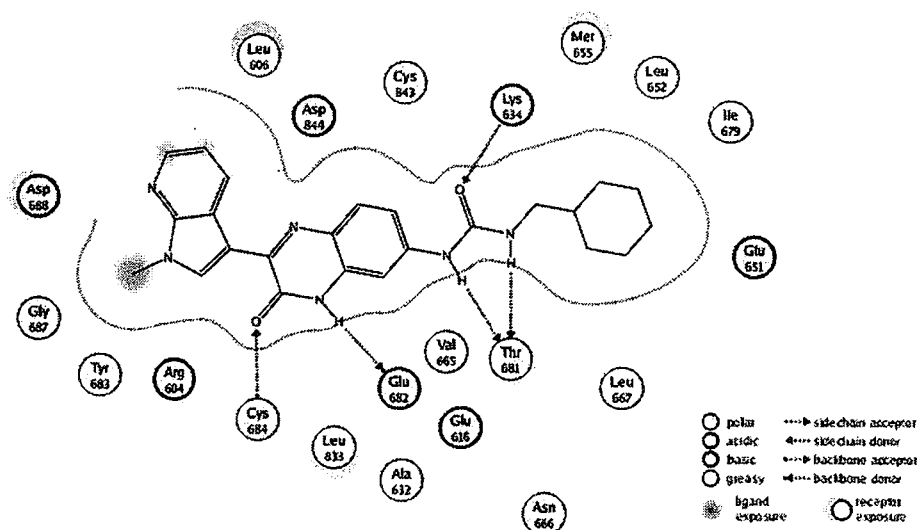


Fig. 4. The summary of the interaction between Cpd.1 and PDGF β receptor tyrosine kinase model. 2-D representation was prepared with MOE.

さらに、プレドッキング法として実施した慣性モーメントを用いたポケット形状比較によるモデル選択法は MD によりサンプリングした多数の候補モデルの中からリガンド分子の形状に合ったポケット形状のモデルだけを抽出できるため、ドッキング計算に掛かる時間を大幅に短縮でき、これまでの MD を用いたプレドッキング法での問題点を回避できた。この方法は、本研究に限らず多くの研究において応用可能な方法である。

インドリルキノキサリン類の PDGF β 受容体との相互作用情報を得るために、本研究ではアルキル鎖の長さのみが異なったインドリルキノキサリン類(Cpd.1-7)を対象としたが、これは活性値との構造活性相関が可能な化合物として、できるだけ構造が類似していて、活性値に大きな差があることが必要であったためである。そのため、今後の課題としてまずは、これまでに構造展開してきたアルキル鎖以外のインドリルキノキサリン類に対してもこの本研究で得られた結合様式が適用可能かどうかを検討し、この結合様式がインドリルキノキサリン類のどの程度の構造変化まで適用できるかを見極める必要がある。さらに、PDGF β 受容体とその他のチロシンキナーゼとの選択性の観点から、インドリルキノキサリン類の PDGF β 受容体以外のチロシンキナーゼに対する相互作用についても検討する必要があると考えている。

引用文献

- 1) Pietras K., Sjoblom T., Rubin K., Heldin C. H. and Ostman A., *Cancer Cell*, **3**, 439-443 (2003).
- 2) Grotendorst G. R., Seppa H. E., Kleinman H. K. and Martin G. R., *Proc Natl Acad Sci USA*, **78**, 3669-3672 (1981).
- 3) Wilcox J. N., Smith K. M., Williams L. T., Schwartz S. M. and Gordon D., *J Clin Invest*, **82**, 1134-1143 (1988).
- 4) Ross R., Masuda J., Raines E. W., Gown A. M., Katsuda S., Sasahara M., Malden L. T., Masuko H. and Sato H., *Science*, **248**, 1009-1012 (1990).
- 5) Ferns G. A., Raines E. W., Sprugel K. H., Motani A. S., Reidy M. A. and Ross R., *Science*, **253**, 1129-1132 (1991).
- 6) Jawien A., Bowen-Pope D. F., Lindner V., Schwartz S. M. and Clowes A. W., *J Clin Invest*, **89**, 507-511 (1992).
- 7) Kilic T., Alberta J. A., Zdunek P. R., Acar M., Iannarelli P., O'Reilly T., Buchdunger E., Black P. M. and Stiles C. D., *Cancer Res*, **60**, 5143-5150 (2000).
- 8) Buchdunger E., Cioffi C. L., Law N., Stover D., Ohno-Jones S., Druker B. J. and Lydon N. B., *J Pharmacol Exp Ther*, **295**, 139-145 (2000).
- 9) Yu J. C., Lokker N. A., Hollenbach S., Apatira M., Li J., Betz A., Sedlock D., Oda S., Nomoto Y., Matsuno K., Ide S., Tsukuda E. and Giese N. A., *J Pharmacol Exp Ther*, **298**, 1172-1178 (2001).
- 10) Abrams T. J., Lee L. B., Murray L. J., Pryer N. K. and Cherrington J. M., *Mol Cancer Ther*, **2**, 471-478 (2003).
- 11) Mendel D. B., Laird A. D., Xin X., Louie S. G., Christensen J. G., Li G., Schreck R. E., Abrams T. J., Ngai T. J., Lee L. B., Murray L. J., Carver J., Chan E., Moss K. G., Haznedar J. O., Sukbuntherng J., Blake R. A., Sun L., Tang C., Miller T., Shirazian S., McMahon G. and Cherrington J. M., *Clin Cancer Res*, **9**, 327-337 (2003).
- 12) Gazit A., Yee K., Uecker A., Bohmer F. D., Sjoblom T., Ostman A., Waltenberger J., Golomb G., Banai S., Heinrich M. C. and Levitzki A., *Bioorg Med Chem*, **11**, 2007-2018 (2003).
- 13) Aoki K., Obata T., Yamazaki Y., Mori Y., Hirokawa H., Koseki J., Hattori T., Niitsu K., Takeda S., Aburada M. and Miyamoto K., *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, **55**, 255-267 (2007)..
- 14) Griffith J., Black J., Faerman C., Swenson L., Wynn M., Lu F., Lippke J. and Saxena K., *Mol Cell*, **13**, 169-178 (2004).
- 15) Zhu X., Kim J. L., Newcomb J. R., Rose P. E., Stover D. R., Toledo L. M., Zhao H. and Morgenstern K. A., *Structure*, **7**, 651-661 (1999).
- 16) Mohammadi M., McMahon G., Sun L., Tang C., Hirth P., Yeh B. K., Hubbard S. R. and Schlessinger J., *Science*, **276**, 955-960 (1997).

- 17) Lin J. H., Perryman A. L., Schames J. R. and McCammon J. A., *J Am Chem Soc*, 124, 5632-5633 (2002).
- 18) Lin J. H., Perryman A. L., Schames J. R. and McCammon J. A., *Biopolymers*, 68, 47-62 (2003).
- 19) Schames J. R., Henchman R. H., Siegel J. S., Sottriffer C. A., Ni H. and McCammon J. A., *J Med Chem*, 47, 1879-1881 (2004).
- 20) Kua J., Zhang Y. and McCammon J. A., *J Am Chem Soc*, 124, 8260-8267 (2002).
- 21) Kua J., Zhang Y., Eslami A. C., Butler J. R. and McCammon J. A., *Protein Sci*, 12, 2675-2684 (2003).
- 22) Sherman W., Day T., Jacobson M. P., Friesner R. A. and Farid R., *J Med Chem*, 49, 534-553 (2006).
- 23) Lyne P. D., Lamb M. L. and Saeh J. C., *J Med Chem*, 49, 4805-4808 (2006).

学位論文審査結果の要旨

血小板由来増殖因子受容体(PDGFR)は、さまざまな癌などの増殖性の疾患に関する創薬ターゲットとして注目されているチロシンキナーゼファミリーの1つである。そのため PDGFR 阻害剤の開発研究が盛んに行われている。しかしながら、より高活性・高選択的な阻害剤の構造デザインには、未だ立体構造が解明されていない PDGFR と候補化合物との相互作用情報が必要不可欠である。本研究は、インドリルキノキサリン類と PDGFR キナーゼドメインとの相互作用情報抽出を目的として、これらの複合体モデルを分子モデリング技術により予測し、構造活性相関により相互作用情報の評価を試みた。

PDGFR キナーゼドメインの立体構造を既知のチロシンキナーゼの構造を参考にモデリングしインドリルキノキサリン類をドッキングさせたところ、ATP 結合部位周辺にインドリルキノキサリン類が結合可能なポケットが存在し、さらに、そのポケットを充填するインドリルキノキサリン類の結合には、2 種類の結合様式が考えられることがわかった。この 2 つの結合様式候補に対し、インドリルキノキサリン類の各結合エネルギーとキナーゼ阻害活性 IC_{50} 値との相関を解析した結果、インドリルキノキサリン類のアルキル鎖が ATP 結合サイト奥の疎水ポケットと相互作用した結合様式に相関傾向($R^2=0.77$)がみられた。よって、この疎水ポケットとの相互作用がインドリルキノキサリン類の活性に大きく関与しているものと考えられた。

以上のように、立体構造が未知の PDGFR キナーゼドメインとインドリルキノキサリン類の複合体モデルを構築し、化合物最適化に重要な相互作用情報を得ることを可能にした本論文は、今後の PDGFR 受容体阻害剤の開発に貢献すること大であると評価されたので、博士(薬学)論文に値すると判定した。